



B2 PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C09B 23/02, 23/10, G01N 33/58</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/53678 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. September 2000 (14.09.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00802 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. März 2000 (09.03.00) (30) Prioritätsdaten: 199 11 421.8 11. März 1999 (11.03.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DY-OMICS [DE/DE]; Botzstrasse 5, D-07743 Jena (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CZERNEY, Peter [DE/DE]; Bodelschwinghstrasse 137, D-99425 Weimar (DE). LEHMANN, Frank [DE/DE]; Friedrich-Ebert-Strasse 28, D-93051 Regensburg (DE). (74) Anwalt: OEHMKE, Volker; Am Schwemmtümpfel 14, D-99441 Magdala (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: DE, US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: LASER-COMPATIBLE NIR-MARKER DYES (54) Bezeichnung: LASER-KOMPATIBLE NIR-MARKER-FARBSTOFFE</p> <div data-bbox="406 1176 1088 1428"><p>(I)</p></div> <p>(57) Abstract The invention relates to so-called laser-compatible NIR-marker dyes on a polymethine basis for use in optical, notably fluorescing-optical, methods of determination and detection, for example in medicine, pharmacy and the biological, materials and environmental sciences. The aim of the invention is to provide NIR-marker dyes on a polymethine basis with high photo- and storage-stability as well as high fluorescence yield, in which fluorescence can be excited as simply as possible by means of laser radiation in the visible or NIR spectral range, notably using light of an argon, helium/neon or diode laser. According to the invention dyes on the basis of polymethines of the general formula (I) are used.</p> <p>(57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft sogenannte Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen zur Verwendung in optischen, insbesondere fluoreszenz-optischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren, beispielsweise in der Medizin, in der Pharmazie sowie in der Bio-, Material- und Umweltwissenschaft. Aufgabe war es, NIR-Marker-Farbstoffe auf Polymethin-Basis mit hoher Photo- und Lagerstabilität sowie hoher Fluoreszenzausbeute zu schaffen, die auf möglichst einfache Weise durch Laserstrahlung im sichtbaren oder NIR-Spektralbereich, insbesondere mit Licht eines Argon-, Helium/Neon- oder Diodenlasers, zur Fluoreszenz angeregt werden können. Erfindungsgemäss werden Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen der allgemeinen Formel (I) eingesetzt.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe

Die Erfindung betrifft sogenannte Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen zur Verwendung in optischen, insbesondere fluoreszenz-optischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren. Typische Verfahrensanwendungen beruhen auf der Reaktion von farbstoffmarkierten Antigenen, Antikörpern oder DNA-Segmenten mit der jeweils komplementären Spezies.

Einsatzmöglichkeiten ergeben sich beispielsweise in der Medizin und der Pharmazie, in der Bio- und Materialwissenschaft, bei der Umweltkontrolle und dem Nachweis von in Natur oder Technik vorkommenden organischen und anorganischen Mikroproben sowie anderes mehr.

Polymethine sind als NIR-Marker seit langem bekannt und zeichnen sich durch intensive, leicht in den NIR-Bereich verschiebbare Absorptionsmaxima aus (Fabian, J.; Nakazumi, H.; Matsuoka, M.: *Chem.- Rev.* 1992, 92, 1197). Bei geeignetem Substituentenmuster und π -Elektronensystem fluoreszieren sie mit ausreichender Quantenausbeute auch im NIR-Bereich. Entsprechend finden diese Verbindungen breite Anwendung in verschiedenen Bereichen der Technik, als Sensibilisatoren in AgX-Materialien, als Laserfarbstoffe, als Quantenzähler, als Indikator-Farbstoffe in der Sensorik und nicht zuletzt als Biomarker („Near-Infrared Dyes for High Technology Applications“, herausgegeben von Daehne, S.; Resch-Genger, U.; Wolfbeis, O.-S., Kluwer, Academic Publishers - Dordrecht/Boston/ London - 1998).

Die Anzahl der als Biomarker verwendeten Polymethine ist begrenzt. Breite kommerzielle Anwendung haben in diesem Sinne bisher nur das sich vom Astraphloxin (DE 415 534) abgeleitete Trimethin Cy3, bzw. das vinyloge Pentamethin Cy5 und das doppelt vinyloge Heptamethin Cy7 mit Absorptionsmaxima bei ca. 550 nm, ca. 650 nm und ca. 750 nm gefunden (US-PS 5 627 027). Darüber hinaus wird das polysulfonierte, vom kommerziellen Heptamethin "Indocyaningreen" bzw. "Cardio Green" abgeleitete Trimethin Cy3.5 und Pentamethin Cy5.5 angeboten (US-PS 5 569 766). In der Polymethinkette aliphatisch verbrückte Heptamethine wurden von Patonay entwickelt (US-PS 5 800 995). Charakteristisch für alle kommerziellen Biomarker sind die sich vom

Inden (Fischer-Base) bzw. Heteroinden ableitenden terminalen Heteroaromaten. Werden methylysubstituierte Cycloimonium-Salze dieses Typs als terminale Polymethin-Bausteine verwendet, so ist es notwendig, mindestens fünf aufeinander folgende sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome (Pentamethine) zwischen den Hetero-
5 cyclen anzuordnen um Absorptionsmaxima an der Grenze zum NIR-Bereich zu erzeugen.

Ein wesentlicher Nachteil der als Biomarker technisch genutzten NIR-Polymethine besteht darin, daß mit Verlängerung der Polymethinkette im steigenden Maße nucleophile bzw. elektrophile Angriffsmöglichkeiten auf die Kette gegeben sind, in
10 deren Folge es zur Zerstörung des π -Systems kommt. Neben der ungenügenden thermischen und photochemischen Stabilität besteht ein weiterer wesentlicher Mangel der Polymethine darin, daß sie neben ihren intensiven Absorptionsmaxima keine weiteren Absorptionsbanden im sichtbaren Spektralbereich aufweisen und in diesem Spektrum, insbesondere durch Argon-Laser mit einer Emissionswellenlänge
15 von $\lambda_{em} = 488$ nm oder He/Ne-Laser mit $\lambda_{em} = 633$ nm bzw. entsprechende Laserdioden ab $\lambda_{em} = 670$ nm, nicht unmittelbar angeregt werden können. Speziell die für "multiple color fluorescence assay's" geeigneten Biomarker können aber nur durch diskrete, vom π -System des Polymethins vorgegebene Lichtquellen (wie die vorgenannten) zur Anregung gebracht werden. Um dennoch derartige
20 Anwendungen zu ermöglichen (bei der Nutzung von "multiple color fluorescence assay's" ist es notwendig mit beispielsweise einer dieser Anregungslichtquellen verschiedene Biomarker mit deutlich unterschiedlichen Emissionmaxima anzuregen), erfolgt die Anregung von Cy5 durch einen Argon-Laser, indem beispielsweise mit Hilfe von Energietransfer über die Anregung von Fluorescein \rightarrow Rhodamin \rightarrow Texas
25 Red \rightarrow Cy5 eine Emission über die Anregung von Licht an der Grenze zum NIR-Bereich bewirkt wird (US-PS 5 800 996). Weitere Möglichkeiten zur Anregung von Cy5, beispielsweise durch einen Argon-Laser bestehen darin, Mikropartikel aus intrinsischen Fluorophoren (Phycobiliproteinen) und dem extrinsischen Cy5 zu erzeugen, die über Energiekaskaden die Anregung des bei 650 nm absorbierenden
30 Cy5-Derivates gestatten (Szöllösi, J.; Damjanovich, S.; Matyus, L.: *Cytometry* 1998, 34, 159).

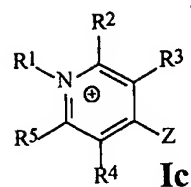
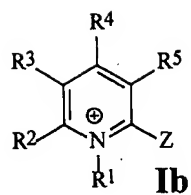
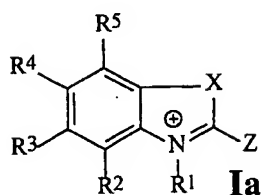
Von Gupta (US-PS 5 783 673) werden Farbstoff-Konjugate beschrieben, die durch die Reaktion von Phycobiliprotein mit aktivierten Fluorescein, Texas Red oder Cy5-Farbstoffen (Phycobiliprotein/Amine-Reactive Dye - PARD) dargestellt wurden. Diese so erhaltenen Farbstoff-Konjugate zeigen im sichtbaren Spektralbereich zusätzliche Absorptionsbanden, die zur Anregung genutzt werden können. Nachteilig an diesen Proben sind die hohe Molmasse, die aufwendige Präparation und die geringe Stabilität dieser Marker-Farbstoffe.

Ein weiteres Beispiel für die Anregung von an sich bei 488 nm nicht absorbierenden Pentamethinen gibt Glazer (US-PS 5 760 201). Durch die kovalente Verknüpfung mit einem im gewünschten Bereich absorbierenden Monomethin über mehrere ammoniumhaltige optimierte Alkylspacer wird zusätzlich eine starke Affinität zur DNA erreicht (spezifische Ionenbindung). Auch hier ist ein entsprechender Verfahrensaufwand zur Anregung unumgänglich. Weitere Nachteile dieser Marker-Farbstoffe bestehen in einer ungenügenden Photo- oder Lagerstabilität, in aufwendigen Synthese- und Reinigungsschritten, in geringen Absorptionskoeffizienten bzw. einer unbefriedigenden Fluoreszenzquantenausbeute sowie in unerwünschten Änderungen der optischen Eigenschaften in Gegenwart von Proteinen oder Nucleinsäureoligomeren bzw. nach Bindung an diese.

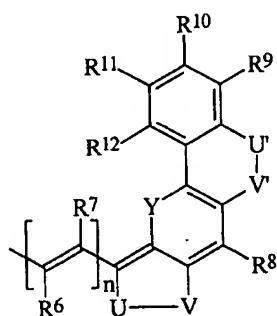
Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, NIR-Marker-Farbstoffe auf Polymethin-Basis mit hoher Photo- und Lagerstabilität sowie hoher Fluoreszenzausbeute zu schaffen, die auf möglichst einfache Weise durch Laserstrahlung im sichtbaren oder im nahen IR-Spektralbereich, insbesondere mit Licht eines Argon-, Helium/Neon- oder Diodenlasers zur Fluoreszenz angeregt werden können.

Erfindungsgemäß werden Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen eingesetzt, die substituierte Benzooxazol-, Benzothiazol-, 2,3,3-Trimethylindolenin-, das 2,3,3-Trimethyl-4,5-benzo-3H-indolenin-, 2- und 4-Picolin-, Lepidin-, Chinaldin- sowie 9-Methylacridinderivate der allgemeinen Formeln Ia oder Ib oder Ic

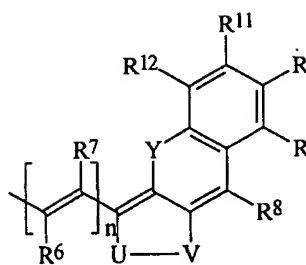
4



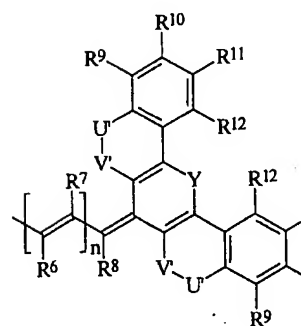
enthalten mit Z als



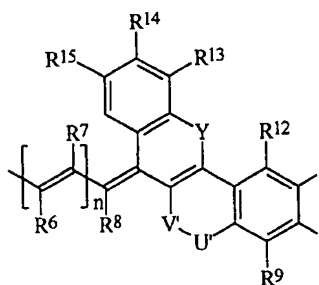
oder



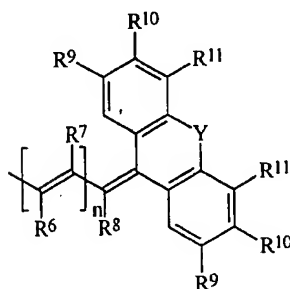
oder



oder



oder



5 wobei

- X bzw. Y für ein Element aus der Gruppe O, S, Se oder das Strukturelement N-alkyl oder C(alkyl)₂ steht,
- n für die Zahlenwerte 1, 2 oder 3 steht,

10

- R¹ - R¹⁵ gleich oder unterschiedlich sind und Wasserstoff, ein oder mehrere Alkyl-, oder Aryl-, Heteroaryl- oder heterocycloaliphatische Reste, eine Hydroxy-

oder Alkoxygruppe, eine alkylsubstituierte oder cyclische Aminfunktion sein können und/oder zwei *ortho*-ständige Reste, z. B. R^2 und R^3 , zusammen einen weiteren aromatischen Ring bilden können,

- 5 - mindestens einer der Substituenten $R^1 - R^{15}$ einen ionisierbaren bzw. ionisierten Substituenten, wie SO_3^- , PO_3^- , COO^- , oder NR_3^+ , darstellen kann, der die hydrophilen Eigenschaften dieser Farbstoffe bestimmt,
- 10 - mindestens einer der Substituenten $R^1 - R^{15}$ für eine reaktive Gruppe stehen kann, welche eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit den oben genannten Trägermolekülen ermöglicht und
- 15 - U-V bzw. U'-V' gleich oder unterschiedlich sind und aus Wasserstoff, aus einer gesättigten aliphatischen, heteroaliphatischen oder aus einer Lacton- bzw. Thiolactongruppierung bestehen können.

In den Unteransprüchen 2-10 sind spezielle Ausführungsformen zu den Marker-Farbstoffen aufgeführt.

- 20 Diese substituierten Indol-, Heteroindol-, Pyridin-, Chinolin- oder Acridinderivate der allgemeinen Formel Ia oder Ib oder Ic können als Farbstoffe zur optischen Markierung von organischen oder anorganischen Mikropartikeln, z. B. von Proteinen, Nucleinsäuren, DNA, biologische Zellen, Lipiden, Pharmaka oder organischen bzw. anorganischen polymeren Trägermaterialien verwendet werden.

- 25 Die Markierung der Partikel kann dabei durch die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen den Markern der allgemeinen Formeln Ia oder Ib oder Ic und dem zu markierenden Materialien erfolgen.

- 30 Die gegenüber Nucleophilen aktivierten funktionellen Gruppen dieser Marker vermögen kovalent an eine OH-, NH_2 - oder SH-Funktion zu koppeln. Somit entsteht ein System zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von organischen und anorganischen Materialien, wie den besagten Proteinen, Nucleinsäuren, DNA,

biologische Zellen, Lipiden, Pharmaka oder organischen bzw. anorganischen Polymeren.

Diese Kopplungsreaktion kann in wäßriger oder überwiegend wäßriger Lösung und vorzugsweise bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Dabei entsteht ein

5 Konjugat mit fluoreszenten Eigenschaften.

Sowohl die Verbindungen der allgemeinen Formeln Ia oder Ib oder Ic und davon abgeleitete Systeme können in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen, qualitativen und quantitativen Bestimmungsverfahren zur Diagnostik von Zelleigenschaften, in Biosensoren (point of care-Messungen), Erforschung des

10 Genoms und in Miniaturisierungstechnologien eingesetzt werden. Typische Anwendungen erfolgen in der Zytometrie und Zellsortierung, der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), im Ultra-High-Troughput-Screening (UHTS), bei der multicolor Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und in Mikroarrays (Genchips).

15

Durch die Darstellung von nichtsymmetrischen Polymethinen, die einerseits als terminale Funktion einen leicht derivatisierbaren Heterocyclus vom Typ der Pyridin-, Chinolin-, Indol-, Heteroindol- bzw. Acridinderivate sowie andererseits einen neuartigen 6-Ringheterocyclus aufweisen, werden insbesondere nachfolgende

20 Vorteile erreicht:

Bereits Trimethine absorbieren im Spektralbereich > 650 nm und zeigen eine gegenüber den bisher bekannten Polymethinen mit Absorptionsmaxima > 650 nm (Penta- und Hepta-methine) eine wesentlich verbesserte photochemische und thermische Stabilität.

25

Durch „molecular engineering“ ist es möglich, Lage und Intensität der Absorptions- und Emissionsmaxima beliebig zu steuern und den Emissionswellenlängen unterschiedlicher Anregungslaser, vor allem NIR-Laserdioden, anzupassen.

Bedingt durch die Auswahl geeigneter terminaler Heterocyclen zeigen die erfindungsgemäßen Farbstoffe zusätzliche Absorptionsmaxima im sichtbaren bzw.

30

NIR-Spektralbereich, die zur Anregung, beispielsweise mit einem Argon-Laser

genutzt werden können. Diese Farbstoffe sind insbesondere zur Anwendung in „multiple color fluorescence assay's“ geeignet.

- Die Marker-Farbstoffe sind durch relativ einfache und in zwei Stufen durchzuführende Synthese herstellbar, mit welcher eine Vielzahl unterschiedlich
- 5 funktionalisierter Farbstoffe, beispielsweise hinsichtlich der Gesamtladung des Farbstoffes und der Anzahl, Spezifität und Reaktivität der zur Immobilisierung genutzten aktivierten Gruppen, anwendungsspezifisch zur Verfügung gestellt werden kann.

- 10 Die Erfindung soll nachstehend anhand von in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Es zeigen:

Fig. 1: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 1 und 2

Fig. 2: Synthese gemäß Ausführungsbeispiel 3

- 15 Fig. 3: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 4 bis 6

Fig. 4: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 7 und 8

Fig. 5: Absorptionsspektrum von C 1601

Fig. 6: Emissionsspektrum von C 1601 (frei, gebunden, 670 nm Diodenlaser)

Fig. 7: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 11 und 12

- 20 Fig. 8: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 13 und 14

Fig. 9: Absorptionsspektrum von C 1591 - NHS-ester

Fig. 10: Emissionsspektrum von C 1591 (frei, gebunden, 670 nm Diodenlaser)

Fig. 11: Emissionsspektrum von C 1591 (frei, gebunden, 488 nm Ar-Ionenlaser)

Fig. 12: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 19 und 20

25

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 2-(2-Ethoxyethenyl)-7-diethylamino-benzo[b]pyrylium perchloraten C 1595 und L 107, vgl. Fig. 1:

- 0,01 mol von einem 2-Methylen-7-diethylamin-benzo[b]pyrylium perchlorat der Formel 1a oder 1b werden in 40 ml Acetanhydrid gelöst und mit 2,0 g
- 30 Triethoxymethan kurz erhitzt. Der nach ca. einer Stunde ausfallende Niederschlag wird abgesaugt und aus Eisessig umkristallisiert.

1: 6-Diethylamino-4-ethoxymethylen-1.2.3.4-tetrahydro-<dibenzo[b,e]pyrylium>

perchlorat C 1595: 3,58 g (87 %) Ausbeute, 178 °C Schmelzpunkt. ¹H NMR (CDCl₃): 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.42 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.78-1.82 (m, 2H), 2.54 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.75 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.59 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 4.53 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 6.93 (dd, J = 2.3, J = 9.3 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 8.52 (s, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃): 12.5, 15.6, 20.2, 21.8, 27.8, 45.8, 73.1, 97.1, 108.3, 115.4, 115.8, 120.3, 130.6, 145.6, 154.8, 157.8, 163.0, 167.9. - C₂₀H₂₆ClNO₆ (411.88): ber. C 58.32, H 6.36, Cl 8.61, N 3.40, gef. C 57.75, H 6.58, Cl 8.43, N 3.46.

10

2: 3-Diethylamino-6-ethoxymethylen-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-

cyclohepta[b]-naphthalen> perchlorat L 107: 3,96 g (93 %) Ausbeute, 158-60 °C Schmelzpunkt. ¹H NMR (CDCl₃): 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.39 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.75-1.77 (m, 2H), 1.85-1.87 (m, 2H), 2.58-2.61 (m, 2H), 2.79-2.83 (m, 2H), 3.58 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 4.56 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 6.99 (dd, J = 2.4, J = 9.3 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 8.18 (s, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃): 12.5, 15.5, 21.1, 23.8, 25.1, 29.2, 45.8, 72.4, 96.3, 113.2, 116.1, 116.3, 124.2, 130.8, 149.0, 155.0, 157.9, 162.8, 171.0. - C₂₁H₂₈ClNO₆ (425.91): ber. C 59.22, H 6.63, Cl 8.32, N 3.29, gef. C 58.76, H 6.39, Cl 8.75, N 3.34.

20

3: 3-Diethylamino-6-[3-(N-acetylanilino)-prop-2-yliden]-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat C 1590, vgl. Fig. 2:

2,13 g (0,005 mol) 2-Methylen-7-diethylamin-benzo[b]pyrylium perchlorat der Formel 1b werden in 40 ml Acetanhydrid gelöst und mit 1,29 g (0,005 mol) (3-Anilinopropenyliden)-phenyl-ammoniumchlorid kurz erhitzt. Der nach ca. einer Stunde ausfallende Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und aus Eisessig umkristallisiert: 2,00 g (74 %) Ausbeute, 216-20 °C Schmelzpunkt. ¹H NMR (CD₃NO₂): 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.64-1.69 (m, 2H), 1.82-1.87 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 2.49 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.89 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.72 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 5.61 (dd, J = 11.8 Hz, J = 13.5 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 2.4 Hz, J = 9.4 Hz, 1H), 7.36-7.39 (m, 2H), 7.54-7.65 (m, 4H), 8.21 (s, 1H), 8.27 (d, J

30

= 13.5 Hz, 1H). ^{13}C NMR (CD_3NO_2): 12.8, 23.5, 25.2, 25.8, 25.9, 30.4, 47.2, 96.2, 109.9, 119.0, 119.3, 127.4, 129.9, 130.6, 130.7, 131.7, 132.0, 132.5, 140.1, 142.2, 151.3, 157.2, 160.1, 169.7, 171.2. - $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_6$ (541.04): ber. C 64.38, H 6.15, Cl 6.55, N 5.18, gef. C 63.73, H 6.15, Cl 6.81, N 5.07.

5

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 2-[6-(N-acetylanilino)-hexatrien-1.3.5-yliden]-benzo[b]pyrylium und thiopyrylium perchloraten C 1586, C 1573 und C 1574, vgl. Fig. 3:

0,005 mol von einem 2-Methylen-7-diethylamin-benzo[b]-pyrylium perchlorat der Formel 1a, 1b oder ein 2-Methylen-4.6-diphenyl-thiopyrylium perchlorat der Formel 1c werden in 40 ml Acetanhydrid gelöst und mit 1,42 g (0,005 mol) (5-Anilinopenta-2.4-dienyliden)-phenyl-ammonium chlorid kurz erhitzt. Der nach ca. einer Stunde ausfallende Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und aus Eisessig umkristallisiert.

15

4: 6-Diethylamino-4-[5-(N-Acetylanilino)-penta-2.4-dienyliden]-1.2.3.4.-tetrahydro-<dibenzo[b;e]pyrylium> perchlorat C 1586: 2,65 g (96 %) Ausbeute, 246-48 °C Schmelzpunkt. ^1H NMR (CD_3NO_2): 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.84-1.88 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 2.67 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.85 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 3.72 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 5.38 (dd, $J = 11.4$ Hz, $J = 13.8$ Hz, 1H), 6.55 (dd, $J = 11.9$ Hz, $J = 14.3$ Hz, 1H), 7.00-7.08 (m, 2H), 7.27-7.33 (m, 3H), 7.56-7.62 (m, 3H), 7.71-7.75 (m, 2H), 8.00 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 8.12 (s, 1H). - $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_6$ (553.05): ber. C 65.15, H 6.01, Cl 6.41, N 5.07, gef. C 63.57, H 6.08, Cl 6.14, N 4.92.

25

5: 3-Diethylamino-6-[5-(N-acetylanilino)-penta-2.4-dienylidene]-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat C 1573: 2,61 g (92 %) Ausbeute, 202 °C Schmelzpunkt. ^1H NMR (CD_3NO_2): 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.78-1.82 (m, 2H), 1.90-1.94 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 2.76 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 2.95 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 3.75 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 5.39 (dd, $J = 11.3$ Hz, $J = 13.9$ Hz, 1H), 6.57 (dd, $J = 11.9$ Hz, $J = 14.3$ Hz, 1H), 6.98-7.06 (m, 2H), 7.32-7.36 (m, 3H), 7.52-7.63 (m, 4H), 7.77 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 8.22 (s, 1H). ^{13}C NMR

30

(CD₃NO₂): 12.3, 22.9, 25.2, 25.5, 25.7, 30.2, 46.8, 95.7, 114.5, 118.7, 119.1, 126.0, 127.7, 129.7, 130.1, 131.1, 131.5, 132.1, 137.8, 140.1, 142.1, 144.4, 150.8, 156.9, 159.8, 169.3, 170.3. - C₃₁H₃₅ClN₂O₆ (567.08): ber. C 65.66, H 6.22, Cl 6.25, N 4.94, gef. C 64.42, H 6.27, Cl 6.13, N 4.78.

5

6: 8-[5-(N-Acetylanilino)-penta-2.4-dienylidene]-2.4-diphenyl-5.6.7.8-tetrahydro-<benzo[b]thiopyrylium>perchlorat C 1574: 2,37 g (79 %) Ausbeute, 216-18 °C Schmelzpunkt. - C₃₄H₃₀ClNO₅S (600.13): ber. C 68.05, H 5.04, Cl 5.91, N 2.33, S 5.34, gef. C 67.34, H 5.03, Cl 5.67, N 2.24, S 5.18.

10

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 7-Diethylamino-2-[3-(1-alkyl-3.3-dimethyl-1.3-dihydro-indol-2-yliden)-propen-1-yl]-benzo[b]pyrylium perchloraten C 1592 und C 1601, vgl. Fig. 4:

- In einer ersten Variante werden 0,005 mol von einem Indolderivat 2a bzw. 2b (Mujumdar, R. T.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S.: *Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 105) zusammen mit 2,13 g (0,005 mol) L 107 in 30 ml Acetanhydrid und 10 Tropfen Piperidin für ca. zehn Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Rohprodukt mit Ethylether gefällt und durch Säulenchromatographie (Silicagel, Methanol/Aceton 1 : 1) gereinigt.
- 15 In einer zweiten Variante kommen (wie in Fig. 4 angedeutet) anstelle von L 107 2,13 g (0,005 mol) von einem Perchlorat 3b (Kanitz, A.; Hartmann, H.; Czerney, P.: *J. Prakt. Chem.* 1998, 340, 34) zur Anwendung. Dabei ist es notwendig, die Reaktionszeit um ca. zehn Minuten zu erhöhen.

25

7: 3-Diethylamino-6-[2-(1-n-butyl-3.3-dimethyl-1.3-dihydro-indol-2-yliden)-ethyliden]-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat C 1592: 1,87 g (63 %) Ausbeute/Variante A, 1,34 g (45 %) Ausbeute/Variante B, 216-18 °C Schmelzpunkt. - HRMS-FAB (C₃₄H₄₃N₂O): ber. 495.337539; gef. 495.335970; D = 1.569 mmU.

30

8: 3-Diethylamino-6-<2-[1-(4-sulfonatobutyl)-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden]-ethylidenl>-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen>kali-um C 1601: 1,25 g (36 %) Ausbeute, 216-18 °C Schmelzpunkt - HRMS-FAB ($C_{34}H_{42}KN_2O_7S_2$): ber. 693.207053; gef. 693.203060; D = 3.99 mmU.

9: *Absorptionsspektren von C 1601*: Fig. 5 zeigt das Absorptionsspektrum von C 1601 in reinem PBS (Phosphate Buffer Saline) und nach der Zugabe von Albumin aus Humanserum (HSA).

10

10: *Fluoreszenzspekten von C 1601*: Fig. 6 zeigt die Emissionsspektren von C 1601 (angeregt durch einen 670 nm Diodenlaser) in reinem PBS und nach der Zugabe von HSA. Die Intensität der Fluoreszenz hat sich nach der Zugabe von HSA um den Faktor fünf verstärkt.

15

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 7-Diethylamino-2-[3-(1-(5-carboxypentyl)-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden)-propen-1-yl]-benzo[b]-pyrylium perchloraten C 1602 und C 1591, vgl. Fig. 7:

1,77 g (0,005 mol) von einem Indolderivat 2c (Mujumdar, R. T.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S.: *Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 105) und 0,005 mol C 1595 bzw. L 107 werden in 40 ml einer Mischung aus Pyridin/Acetanhydrid (1/1) für ca. zehn Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Rohprodukt mit Ethylether gefällt und durch Säulenchromatographie (Silicagel, Methanol) gereinigt.

25

11: 6-Diethylamino-4-<2-[1-(5-carboxypentyl)-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden]-ethylidenl>-1.2.3.4-tetrahydro-<dibenzo[b,e]pyrylium> betain C 1602: 2,20 g (71 %) Ausbeute, >310 °C Schmelzpunkt. - $C_{35}H_{44}KN_2O_7S$ (657.89 * H_2O): ber. C 62.20, H 6.56, N 4.14, S 4.74, gef. C 61.74, H 6.53, N 4.06, S 4.26. - HRMS-FAB ($C_{35}H_{43}N_2O_6S$): ber. 619.284184; gef. 619.286390; D = -2.205 mmU.

30

- 12: 3-Diethylamino-6-<2-[1-(5-carboxypentyl)-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden]-ethyliden>-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> betain C 1591: 2,15 g (68 %) Ausbeute, >340 °C Schmelzpunkt. - $C_{36}H_{46}KN_2O_7S$ (671.91 * H_2O): ber. C 62.68, H 6.73, N 4.06, S 4.64, gef. C 62.37, H 6.61, N 4.07, S 4.34. - HRMS-FAB ($C_{36}H_{45}N_2O_6S$): ber. 633.299834; gef. 633.308710; D = -8.875 mmU.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von NHS-ester mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)/N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), vgl. Fig. 8:

- 10 15 mg C 1602 bzw. C 1591, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden in 1 ml trockenem DMF gelöst und mit 10 µl Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Ether gewaschen und am Ölpumpenvakuum getrocknet.

15

13: C 1602-NHS-ester: Die Reaktion verläuft quantitativ.

14: C 1591-NHS-ester: Die Reaktion verläuft quantitativ.

- 20 15: Kovalente Markierung von Albumin aus Humanserum (HSA) mit C 1591-NHS-ester:

C 1591-NHS-ester (ca. 0,5 mg) werden in 50 µl DMF und 5 mg HSA in 750 µl Bicarbonatpuffer (0.1 mol/l, pH = 9.0) gelöst. Beide Lösungen werden langsam vereint und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das markierte HSA durch Gelchromatographie vom nicht gebundenen Farbstoff

25 getrennt. Als stationäre Phase dient Sephadex G50, als Laufmittel Phosphatpuffer (22 mmol/l, pH 7.2).

- 16: Absorptionsspektren von C 1591-Derivaten: Fig. 9 zeigt das
- 30 Absorptionsspektrum von einem aktivierten C 1591-NHS-ester und C 1591 kovalent

gebunden an HSA. Als Lösungsmittel wurde für beide Messungen PBS (Phosphate Buffer Saline) verwendet.

17: *Fluoreszenzspektren von C 1591-Derivaten:* Fig. 10 zeigt das Emissionsspektrum von einem aktivierten C 1591-NHS-ester und C 1591 kovalent gebunden ans HSA.

Zur Anregung wurde ein 670 nm Diodenlaser (*Spindler & Hoyer*, Leistung max. 3 mW) verwendet. Als Lösungsmittel für beide Messungen diente PBS.

18: *Fluoreszenzspektren von C 1591-Derivaten:* Fig. 11 zeigt das Emissionsspektrum von einem aktivierten C 1591-NHS-ester und C 1591 kovalent gebunden an HSA.

Zur Anregung wurde ein 488 nm Ar-Ionenlaser (*Ion Laser Technology*, Leistung max. 100 mW) verwendet. Als Lösungsmittel für beide Messungen diente PBS.

15

19: *3-Diethylamino-6-<2-[1-(3-acetoxypentyl)-3,3-dimethyl-1,3-dihydro-indol-2-yliden]-ethyliden>-7,8,9,10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat C 1594, vgl. Fig. 12:*

1,94 g (0,005 mol) 1-(1-Acetoxypropyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolinium iodid 2d (*Brush et al.*, US-PS 5 808 044) und 2,13 g (0,005 mol) L 107 werden in einer Mischung aus jeweils 20 ml Pyridin und 20 ml Acetanhydrid ca. 20 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die noch acetylierte Zwischenstufe mit Ether gefällt und im Vakuum getrocknet. Die Reinigung des Produktes erfolgt durch präparative Säulenchromatographie (Silicagel, Methanol). 0,87 g (29 %) Ausbeute, 155-62 °C Schmelzpunkt. - HRMS-FAB ($C_{35}H_{43}N_2O_3$): ber. 539.327368; gef. 539.328510; D = -1.142 mmU.

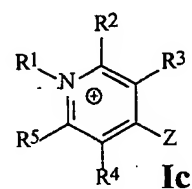
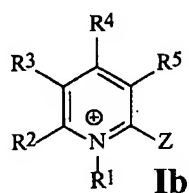
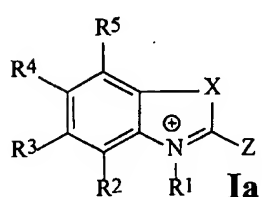
20: *Darstellung vom C 1594-phosphoramidit, vgl. Fig. 12:*

Zur Hydrolyse werden 200 mg C 1594 in 10 ml Methanol gelöst und unter Zugabe von 50 mg Natriumcarbonat zwei Stunden gerührt. Im Anschluß daran wird filtriert sowie der entacetylierte Farbstoff durch Zugabe von Ether ausgefällt und getrocknet.

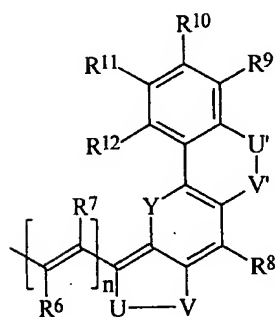
- Das erhaltene Produkt wird in trockenem DMF gelöst und mit 0.15 ml *N,N*-Diisopropylamin versetzt. Zu dieser Lösung gibt man im Verlauf einer Stunde dreimal je 40 µl 2-Cyanoethyl-*N,N*-Diisopropylchlorophosphoramidit. Dabei wird der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach quantitativem
- 5 Ablauf der Reaktion das Produkt direkt zum Markieren von DNA eingesetzt.

Patentansprüche

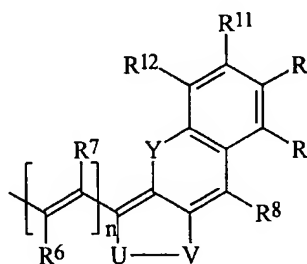
1. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen,
 enthaltend substituierte Benzooxazol-, Benzothiazol-, 2,3,3-Trimethylindolenin-,
 das 2,3,3-Trimethyl-4,5-benzo- 3*H*-indolenin-, 2- und 4-Picolin-, Lepidin-,
 Chinaldin- sowie 9-Methylacridinderivate der allgemeinen Formeln Ia oder Ib
 oder Ic



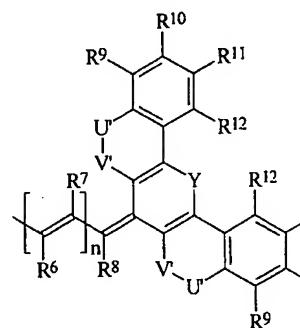
10 mit Z als



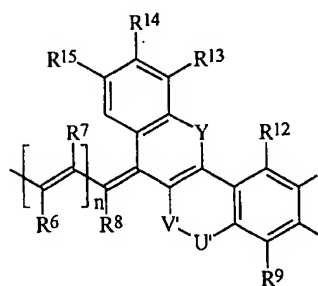
oder



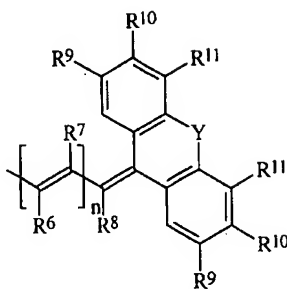
oder



oder



oder



wobei

- X bzw. Y für ein Element aus der Gruppe O, S, Se oder das Strukturelement N-alkyl oder C(alkyl)₂ steht,
- n für die Zahlenwerte 1, 2 oder 3 steht,

5

- R¹ - R¹⁵ gleich oder unterschiedlich sind und Wasserstoff, ein- oder mehrere Alkyl-, oder Aryl-, Heteroaryl- oder heterocycloaliphatische Reste, eine Hydroxy- oder Alkoxygruppe, eine alkylsubstituierte oder cyclische Aminfunktion sein können und/oder zwei *ortho*-ständige Reste, z. B. R² und R³, zusammen einen weiteren aromatischen Ring bilden können,

10

- mindestens einer der Substituenten R¹ - R¹⁵ einen ionisierbaren bzw. ionisierten Substituenten, wie SO₃⁻, PO₃⁻, COO⁻, oder NR₃⁺, darstellen kann, der die hydrophilen Eigenschaften dieser Farbstoffe bestimmt,

15

- mindestens einer der Substituenten R¹ - R¹⁵ für eine reaktive Gruppe stehen kann, welche eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit den oben genannten Trägermolekülen ermöglicht und

20

- U-V bzw. U'-V' gleich oder unterschiedlich sind und aus Wasserstoff, aus einer gesättigten aliphatischen, heteroaliphatischen oder aus einer Lacton- bzw. Thiolactongruppierung bestehen können.

25

2. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktive Gruppe aus folgenden Funktionalitäten ausgewählt ist: Isothiocyanate, Isocyanate, Monochlortriazine, Dichlortriazine, Aziridine, Sulfonylhalogenide, N-Hydroxysuccinimidester, Imido-Ester, Glyoxal oder Aldehyd für Amin- und Hydroxy-Funktionen bzw. Maleimide oder Iodacetamide für Thiol-Funktionen sowie Phosphoramidite für die Markierung

30

der DNA oder RNA oder deren Bruchstücke.

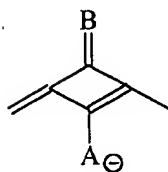
3. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktive Gruppe über Spacer-Gruppen der allgemeinen Struktur $-(CH_2)_m-$ am eigentlichen Chromophor gebunden ist, wobei m Werte von 1 bis 18 annehmen kann.

5

4. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit $=CR^7-$ auch eine Verbrückung über vier-
fünf- und sechsgliedrige Ringsysteme beinhaltet, wobei sich an dieser auch
reaktive Gruppen befinden und die Substituenten A - G die gleiche
Funktionalität wie die Substituenten $R^1 - R^{15}$ besitzen können.

10

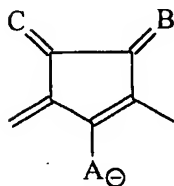
5. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit $=CR^7-$ ($n = 2$) für



steht.

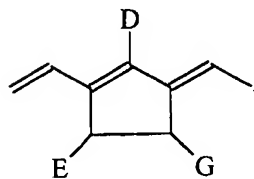
15

6. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit $=CR^7-$ ($n = 2$) für



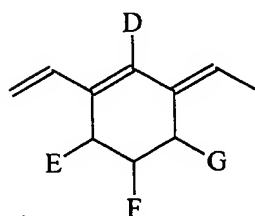
steht.

7. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit $=CR^7-$ ($n = 3$) für



steht.

- 5 8. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit $=CR^7-$ ($n = 3$) für



steht.

9. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Substituenten A - C für O, S, $C(CN)_2$ bzw. N-R stehen, wobei R in N-R für einen aliphatischen oder aromatischen bzw. einem reaktiven aliphatischen oder aromatischen Rest, wie $(CH_2)_nCOOH$ oder $(CH_2)_nNH_2$, stehen kann.

10. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Substituent D für Cl oder ein aromatisches bzw. aliphatisches Ringsystem steht, an dem gegebenenfalls reaktive Substituenten entsprechend den R^1 bis R^{15} angebracht sind.

1/7

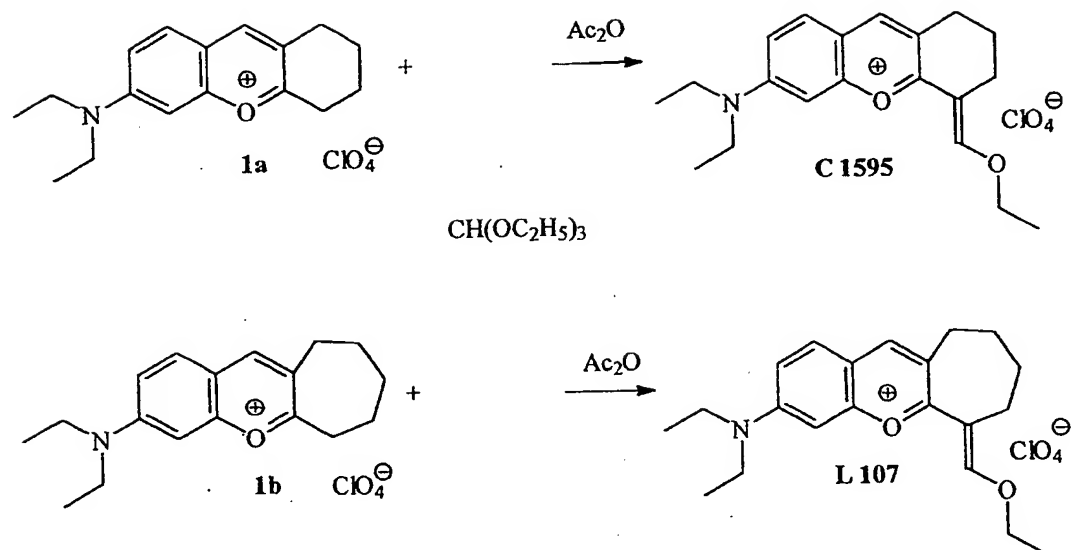


Fig. 1

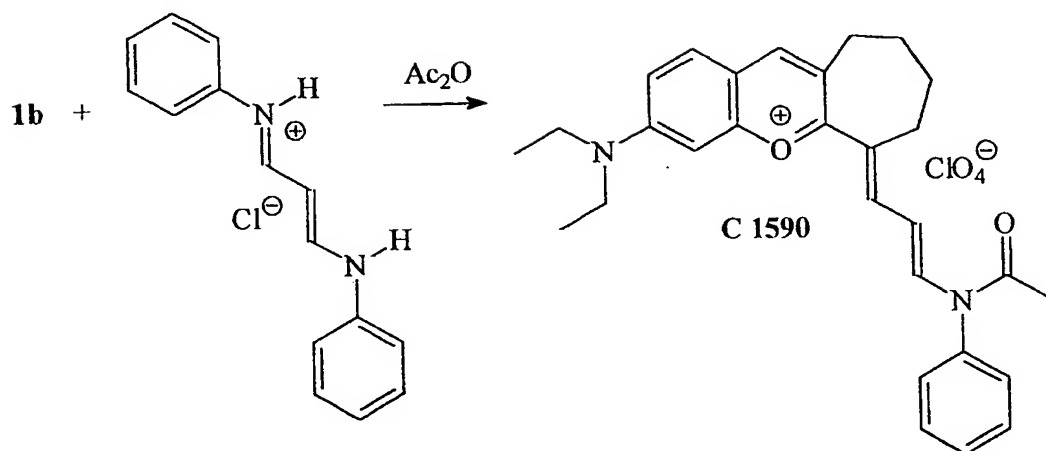


Fig. 2

2/7

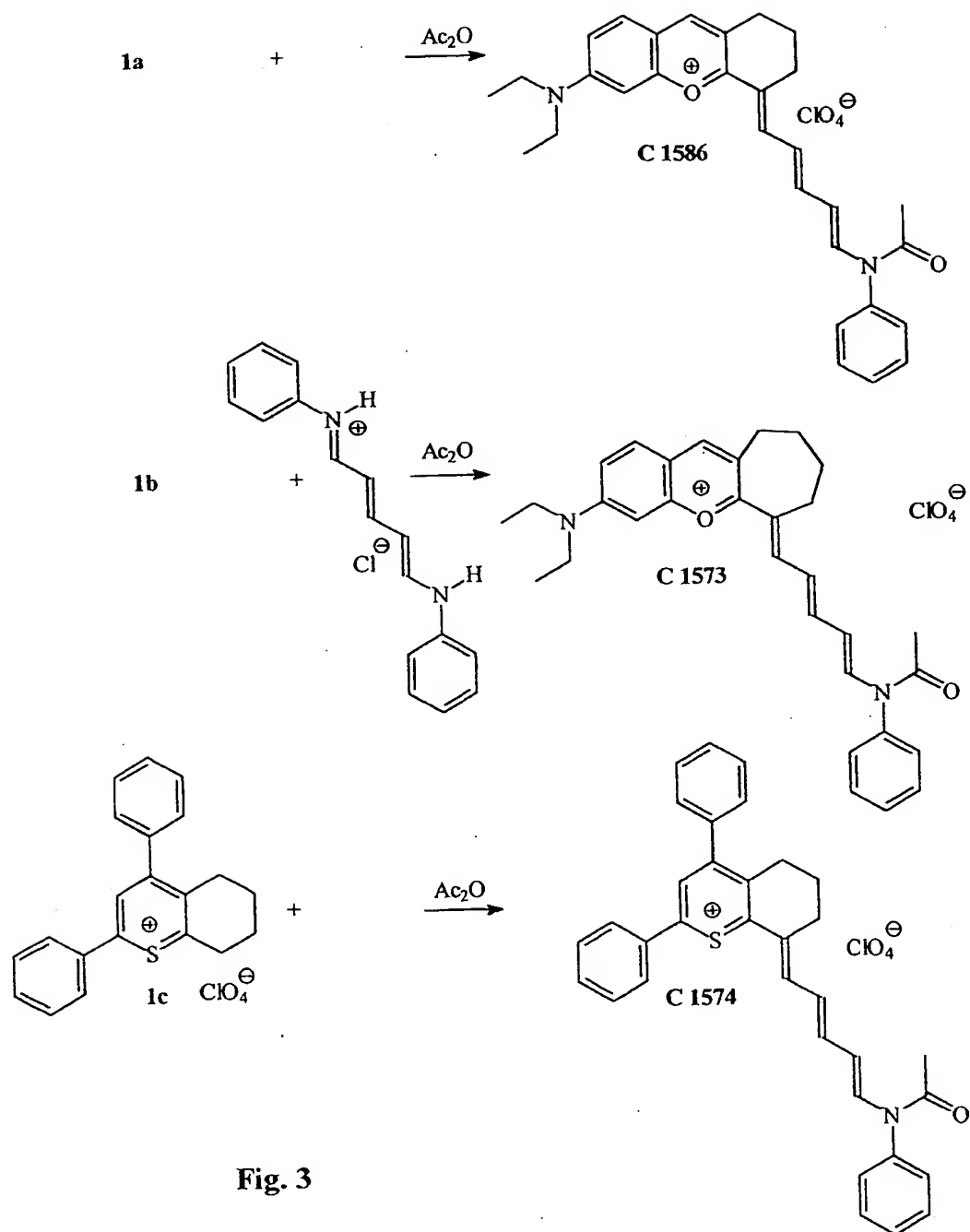


Fig. 3

3/7

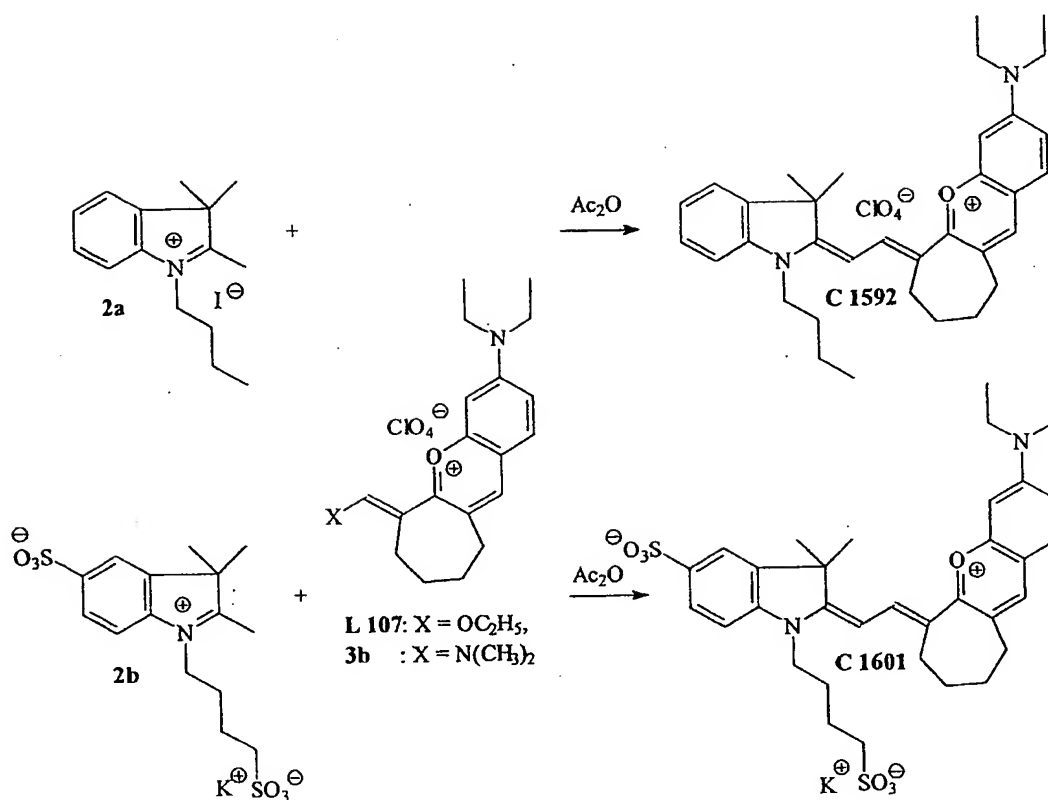


Fig. 4

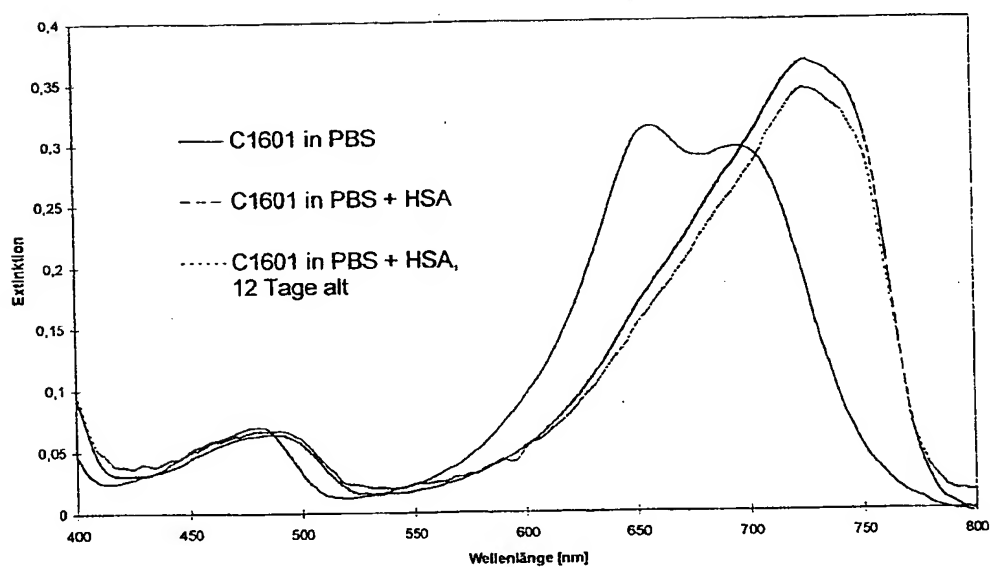


Fig. 5

4/7

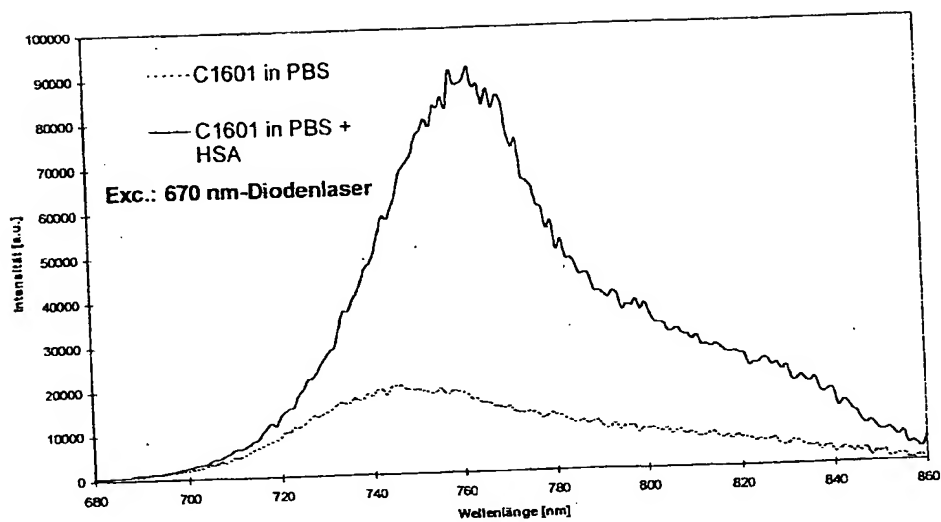


Fig. 6

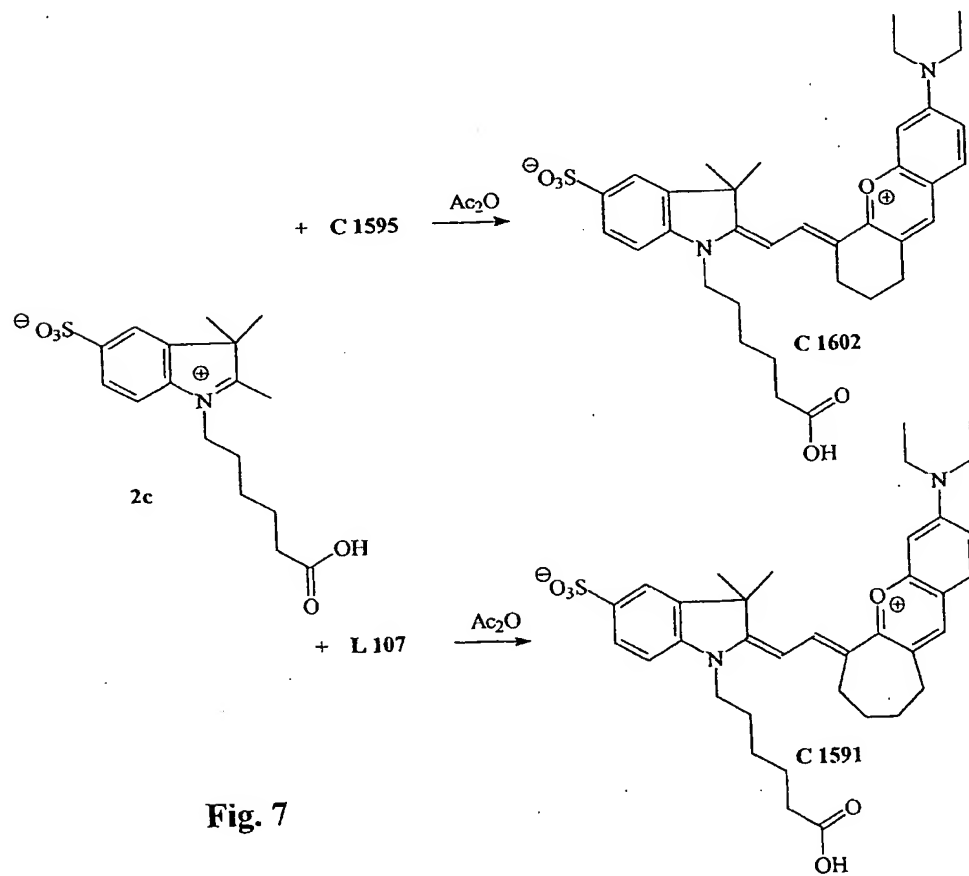


Fig. 7

5/7

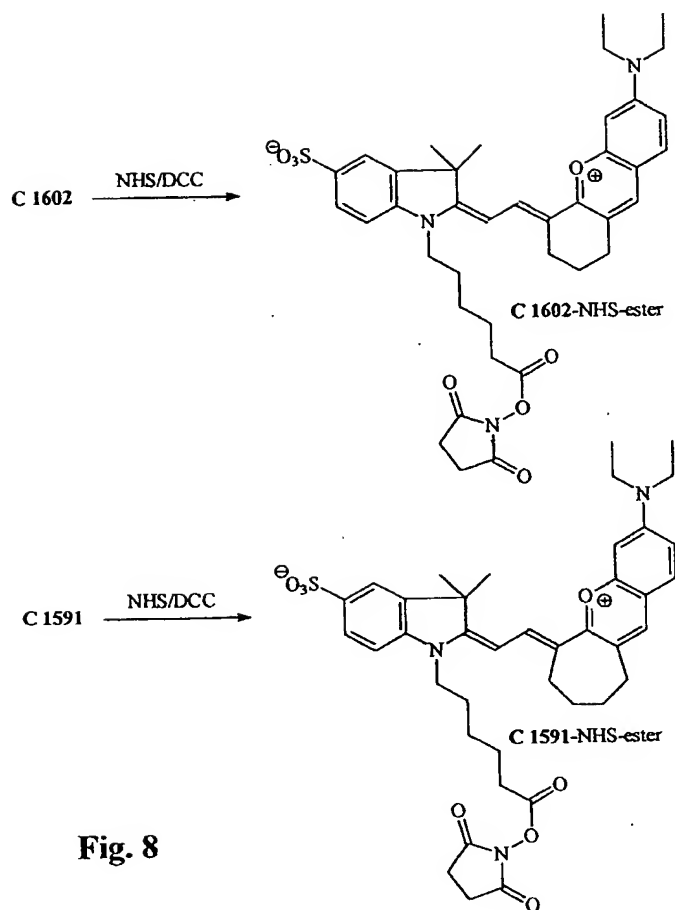


Fig. 8

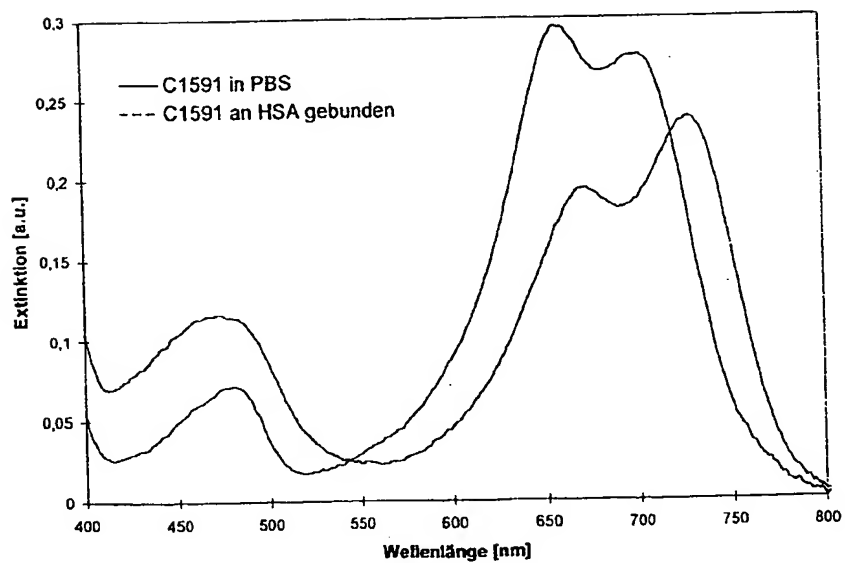


Fig. 9

6/7

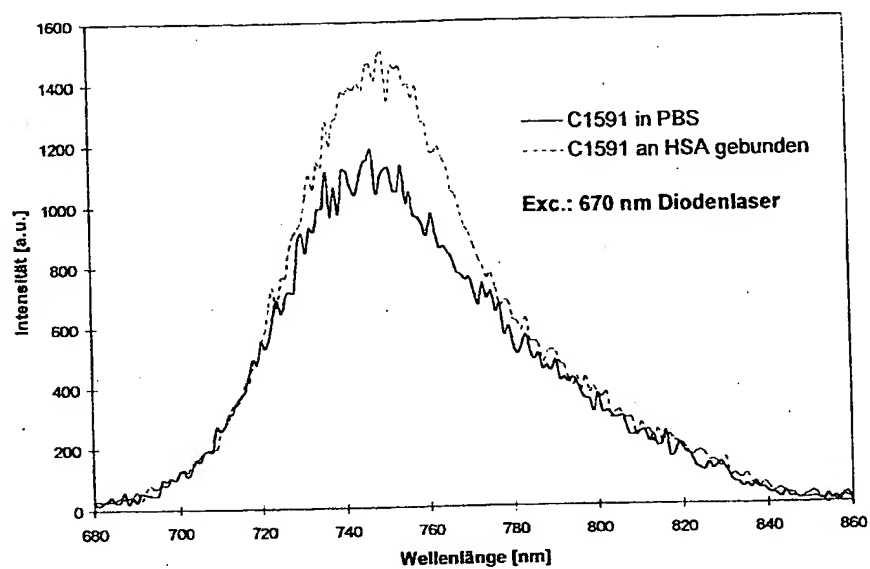


Fig. 10

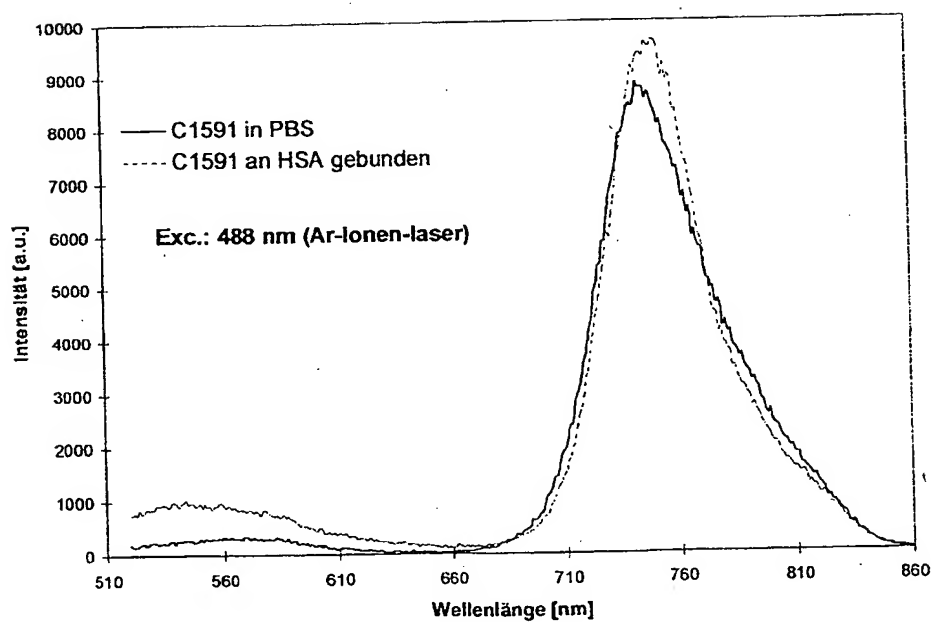


Fig. 11

7/7

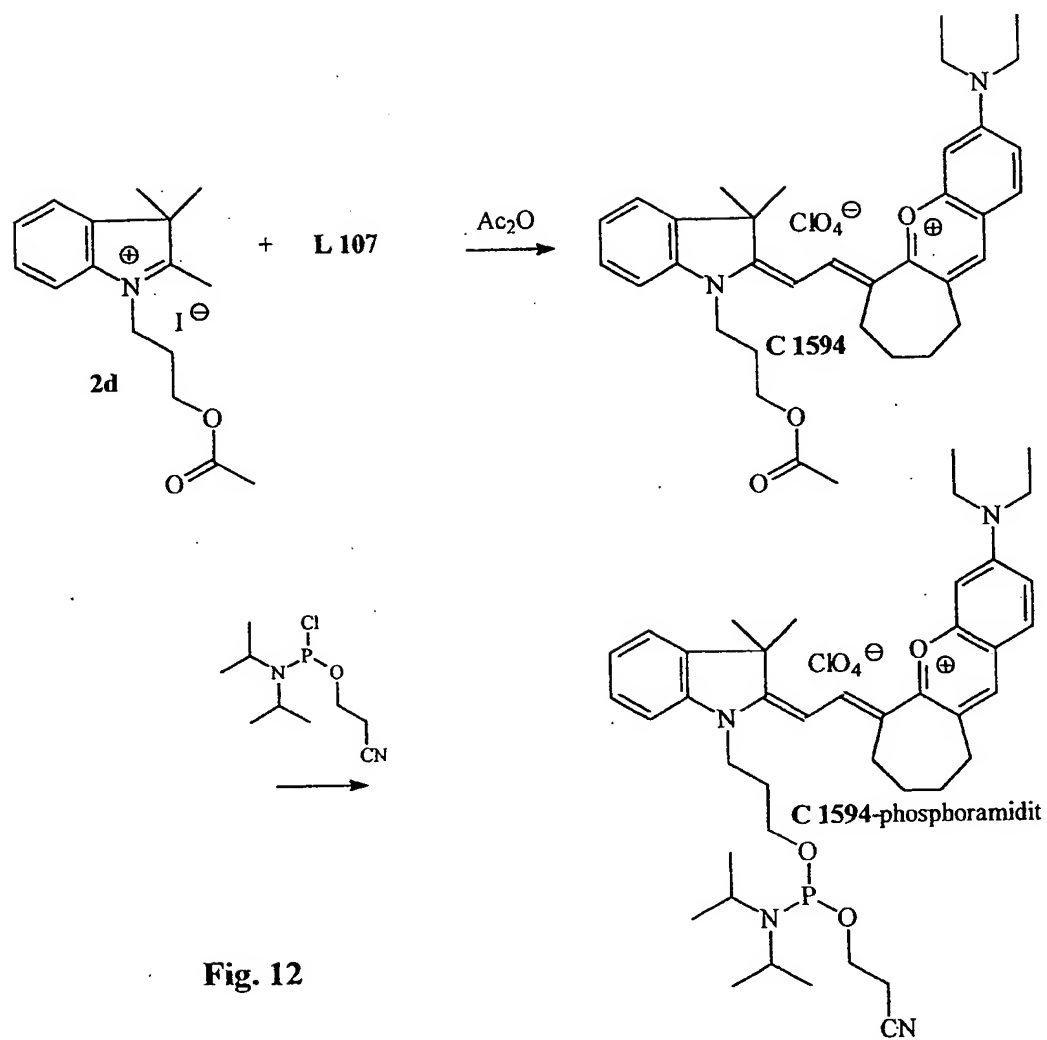


Fig. 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No

PCT/DE 00/00802

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C09B23/02 C09B23/10 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C09B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 13552 A (MOLECULAR PROBES INC) 9 May 1996 (1996-05-09) claims 1-21; examples 1-18; tables 3-5 ---	1-10
A	WO 94 24213 A (MOLECULAR PROBES INC) 27 October 1994 (1994-10-27) claims 1-14 ---	1-10
A	US 5 760 201 A (GLAZER ET AL) 2 June 1998 (1998-06-02) cited in the application claims; figures 2,5,6; examples ---	1-10
A	WO 96 41144 A (HYPERION INC) 19 December 1996 (1996-12-19) page 9, line 21 -page 13, line 31; claims; figures 7Q,7R,7U,7V ---	1-10
	-/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 2000

Date of mailing of the international search report

12/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ginoux, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Patent Application No

PCT/DE 00/00802

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 39 12 046 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 15 March 1990 (1990-03-15) page 9, line 22 -page 12, line 48; claims 1,42-49 -----	1-10
A	HIROYUKI NAKAZUMI AND MASARU MATSUOKA: "Near-Infrared Absorbing Dyes" CHEMICAL REVIEWS,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 1197-1226, XP002076242 ISSN: 0009-2665 cited in the application page 1207, left-hand column, paragraph 3 -page 1210, right-hand column, paragraph 1 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. Application No

PCT/DE 00/00802

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9613552 A	09-05-1996	US 5658751 A	19-08-1997
		AU 714890 B	13-01-2000
		AU 3967295 A	23-05-1996
		EP 0740689 A	06-11-1996
		JP 9507879 T	12-08-1997
		US 5863753 A	26-01-1999
WO 9424213 A	27-10-1994	AU 676317 B	06-03-1997
		AU 6634594 A	08-11-1994
		CA 2133765 A	27-10-1994
		EP 0675924 A	11-10-1995
		US 5436134 A	25-07-1995
		US 5545535 A	13-08-1996
		US 5534416 A	09-07-1996
		US 5445946 A	29-08-1995
		US 5658751 A	19-08-1997
US 5760201 A	02-06-1998	US 5565554 A	15-10-1996
		US 5929227 A	27-07-1999
		WO 9604405 A	15-02-1996
WO 9641144 A	19-12-1996	US 5880287 A	09-03-1999
		CA 2223418 A	19-12-1996
		CN 1198816 A	11-11-1998
		US 5919922 A	06-07-1999
		US 6060598 A	09-05-2000
DE 3912046 A	15-03-1990	JP 2191674 A	27-07-1990
		JP 2757965 B	25-05-1998
		JP 10096727 A	14-04-1998
		JP 2898264 B	31-05-1999
		JP 10088012 A	07-04-1998
		US 5486616 A	23-01-1996
		US 5569766 A	29-10-1996
		US 5569587 A	29-10-1996
		US 5268486 A	07-12-1993

PCT/DE 00/00802

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter naies Aktenzeichen

PCT/DE 00/00802

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 39 12 046 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 15. März 1990 (1990-03-15) Seite 9, Zeile 22 -Seite 12, Zeile 48; Ansprüche 1,42-49 ----	1-10
A	HIROYUKI NAKAZUMI AND MASARU MATSUOKA: "Near-Infrared Absorbing Dyes" CHEMICAL REVIEWS,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, 1. Januar 1992 (1992-01-01), Seiten 1197-1226, XP002076242 ISSN: 0009-2665 in der Anmeldung erwähnt Seite 1207, linke Spalte, Absatz 3 -Seite 1210, rechte Spalte, Absatz 1 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00802

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9613552 A	09-05-1996	US 5658751 A	19-08-1997
		AU 714890 B	13-01-2000
		AU 3967295 A	23-05-1996
		EP 0740689 A	06-11-1996
		JP 9507879 T	12-08-1997
		US 5863753 A	26-01-1999
WO 9424213 A	27-10-1994	AU 676317 B	06-03-1997
		AU 6634594 A	08-11-1994
		CA 2133765 A	27-10-1994
		EP 0675924 A	11-10-1995
		US 5436134 A	25-07-1995
		US 5545535 A	13-08-1996
		US 5534416 A	09-07-1996
		US 5445946 A	29-08-1995
		US 5658751 A	19-08-1997
US 5760201 A	02-06-1998	US 5565554 A	15-10-1996
		US 5929227 A	27-07-1999
		WO 9604405 A	15-02-1996
WO 9641144 A	19-12-1996	US 5880287 A	09-03-1999
		CA 2223418 A	19-12-1996
		CN 1198816 A	11-11-1998
		US 5919922 A	06-07-1999
		US 6060598 A	09-05-2000
DE 3912046 A	15-03-1990	JP 2191674 A	27-07-1990
		JP 2757965 B	25-05-1998
		JP 10096727 A	14-04-1998
		JP 2898264 B	31-05-1999
		JP 10088012 A	07-04-1998
		US 5486616 A	23-01-1996
		US 5569766 A	29-10-1996
		US 5569587 A	29-10-1996
		US 5268486 A	07-12-1993